

Relación entre la expresión de TCP y autoaglutinación en cepas patogénicas de *Vibrio cholerae*

Celso Pérez Bolaños, Nadine Vega Pérez, Rafael Fando Calzada, Boris L. Rodríguez González,* Gustavo Falero Díaz** y Javier Campos Gómez.

Dpto. Biología Molecular, *Dpto. Microbiología e Inmunología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Código Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Habana, Cuba. Correo electrónico: celso.perez@cnic.edu.cu ³ Dpto. Anticuerpos Monoclonales, Instituto Finlay, Avenida 27, No.19805, La Lisa, Código Postal 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 22 de abril de 2008. Aceptado: 23 de septiembre de 2008.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, autoaglutinación, *pilus*, patogénesis.
Key words: *Vibrio cholerae*, autoagglutination, *pilus*, pathogenesis.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda, producida por la bacteria gramnegativa *Vibrio cholerae*. Los datos epidemiológicos acumulados han demostrado que las pandemias registradas históricamente han sido causadas por el serogrupo O1 (biotipos Clásico y El Tor) y posteriormente, en 1992 por el serogrupo O139 de este patógeno.¹ Varios factores de virulencia contribuyen a su patogenicidad, pero los reconocidos como más importantes son la toxina colérica (CT) y el *pilus* co-regulado con la toxina (TCP, del inglés *Toxin Co-regulated Pilus*).

CT es una toxina típica del grupo A-B de toxinas de subunidades, la cual es responsable de las diarreas copiosas y deshidratantes características del cólera.² Los genes *ctxAB*, que codifican a CT, forman parte del genoma del fago filamentososo CTX ϕ , el cual se encuentra integrado en el cromosoma I de las cepas toxigénicas de *V. cholerae*. TCP también funciona como receptor del fago CTX ϕ , portador de los genes de CT.³ Por otra parte, TCP es una fimbria tipo 4, que desempeña un papel fundamental en la colonización por *V. cholerae* del intestino humano, uno de los eventos primarios en la patogénesis.^{4,5} La secuencia aminoacídica de TcpA, la pilina principal de la fimbria, se encuentra muy conservada en las cepas virulentas, con cerca del 100 % de identidad entre las cepas del serogrupo O1 biotipo El Tor y las del serogrupo O139. En el caso de las cepas del biotipo Clásico del serogrupo O1 presentan cerca de un 89 % de identidad con las cepas El Tor y O139.⁶

Un estudio genético a través de mutaciones en el gen que codifica la subunidad mayoritaria del *pilus*, *tcpA*, dentro de ciertos dominios relacionados con la estructura y funciones de TCP y los efectos producidos ha contribuido a esclarecer el mecanismo de la colonización. El modelo propuesto por los autores supone la migración y adhesión de los vibriones coléricos a las células epiteliales del intestino delgado, mediada por flagelos, proteínas de la membrana externa y posiblemente otras adhesinas superficiales aún no identificadas. Luego de la adhesión inicial, la síntesis de TCP incrementaría el contacto con las células epiteliales. La acumulación de las bacterias sobre la superficie del epitelio conduce a la formación

de microcolonias.⁴ La autoaglutinación de células de *Vibrio* en cultivos *in vitro* ha sido asociada a la presencia de TCP y se le ha adjudicado una función directa en la interacción *in vivo* entre células bacterianas a través del contacto directo *pilus-pilus*. Sin embargo, muchos aspectos de este mecanismo aun son desconocidos.^{4,7}

Observaciones preliminares en el grupo de trabajo de los autores cuestionan el papel de TCP en la autoaglutinación. La asociación entre TCP y este fenotipo en un grupo de cepas epidémicas de *V. cholerae* parece ser diferente. Por ejemplo, muchas cepas crecidas en condiciones de expresión de TCP no autoaglutinan, mientras que otras sí lo hacen bajo condiciones no idóneas de expresión de esta fimbria. Por otra parte, la cepa KHT52, mutante de TCP, no se diferencia en la autoaglutinación de su cepa parental isogénica C6706. Estas observaciones no corresponden con el modelo propuesto.⁴

Las diferentes cepas toxigénicas estudiadas en este trabajo incluyeron los serogrupos O1 (biotipos Clásico y El Tor) y O139 de *V. cholerae*. Para evaluar el fenotipo de autoaglutinación, estas fueron crecidas en condiciones *in vitro* apropiadas para la expresión de TCP, según se ha descrito.^{6,8} Brevemente, las cepas Clásicas fueron crecidas en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB), pH 6,5 con agitación en zaranda orbital, 200 r/min, a 30 °C, durante 16 h. Por otra parte, las cepas El Tor y O139 fueron inicialmente crecidas en agar sangre y luego, una colonia de cada una resuspendida en 10 mL de medio AKI, pH 7,4 durante 4 h en reposo a 37 °C y finalmente, agitadas en zaranda, 200 r/min durante 18 h, 37 °C. La autoaglutinación fue evaluada mediante medición de la densidad óptica (DO) a λ 600 nm de los cultivos crecidos en zaranda, luego de 2 h en reposo a temperatura ambiente. La autoaglutinación [AA, (%)] fue determinada según:

$$\left(1 - \frac{DO_f}{DO_i}\right) \cdot 100$$

donde:

DO_i (a las 0 h).

DO_f (a las 2 h).

El valor de autoaglutinación obtenido para cada cepa osciló entre 11,0 y 98,3 % (Tabla 1), pero en general fue inferior al 30 % (12 cepas = 30 %, 6 cepas > 30 %).

La presencia de ADN que codifica para *TcpA*, se comprobó mediante PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos CNC-6048 (5'-CAGGATCCTATGACAT-TAATCGAAG-3') y CNC-6050 (5'-CTTAAGAATTGCCCCATTTCCATGG-3'), para amplificar el gen *tcpA* de las cepas del biotipo El Tor y las del serogrupo O139, y los oligos CNC-6048 y CNC-6051 (5'-TTGAATTCAATAAGTTGCCCATTA-3'), para amplificar *tcpA* de las cepas del biotipo Clásico. Se obtuvo una banda del tamaño esperado según los oligonucleótidos utilizados, 671 pb en el caso de las cepas El Tor y O139 y 677 pb en las Clásicas (Fig. 1A). La presencia de este gen en las cepas estudiadas fue además

corroborada mediante hibridación por *Southern blotting*, empleando como sonda el fragmento de ADN amplificado con los oligos CNC-6048 y CNC-6051, correspondiente al gen *tcpA*, marcado con digoxigenina. Los patrones de bandas de hibridación utilizando esta sonda y luego de digerir los ADNs genómicos de las cepas estudiadas con la enzima de restricción *HindIII*, correspondieron a lo esperado [1,56 kb en cepas El Tor y O139 y 1,95 kb en las Clásicas, (Fig. 1B)]. Nótese que tanto en el PCR como en el *Southern*, KHT52 (carrilera 3), mostró una banda de alrededor de 100 pb menor, puesto que esa cepa contiene una delección de ese tamaño en el gen *tcpA*. La expresión de TCP fue detectada cualitativamente mediante *Western blotting* de los extractos de células completas de cada cepa, utilizando en la inmunodetección

Tabla 1. Autoaglutinación y susceptibilidad a CTX-knφ de diferentes cepas epidémicas de *Vibrio cholerae*.

Cepa	Descripción (serogrupo/biotipo/serotipo)	Autoaglutinación ^a (%) (X ± D.S.)	Expresión de TCP ^b	Susceptibilidad a CTX-knφ ^c (X ± D.S.)
569B	O1/Clásico/Inaba	15,3 ± 3,10	+	2,1 ± 0,14 · 10 ⁶
O395	O1/Clásico/Ogawa	36,1 ± 4,64	+	5,2 ± 0,35 · 10 ⁴
CA401	O1/Clásico/Inaba	10,1 ± 5,92	+	< 50
NIH35A3	O1/Clásico/Inaba	52,5 ± 1,40	+	2,6 ± 0,28 · 10 ⁴
CA385	O1/Clásico/Ogawa	98,7 ± 0,095	+	< 50
1395	O1/Clásico/Inaba	41,1 ± 9,28	+	6,4 ± 1,98 · 10 ⁴
C6706	O1/El Tor/Inaba	19,4 ± 0,52	+	N.A.
KHT46	C6706 Δ <i>mshA1</i>	20,7 ± 0,45	+	N.A.
KHT52	C6706 Δ <i>tcpA10</i>	19,7 ± 1,98	-	N.A.
C7258	O1/El Tor/Ogawa	18,2 ± 0,15	+	N.A.
E7946	O1/El Tor/Ogawa	31,0 ± 1,93	+	N.A.
N16961	O1/El Tor/Inaba	34,4 ± 2,04	+	N.A.
Lima	O1/El Tor/Inaba	14,8 ± 1,36	+	N.A.
Gamene	O1/El Tor/Ogawa	18,5 ± 1,08	+	N.A.
CRC266	O139	21,6 ± 0,91	+	N.A.
MO45	O139	37,6 ± 3,76	+	N.A.
SG25-1	O139	78,5 ± 2,00	+	N.A.
MDO12C	O139	35,4 ± 1,82	+	N.A.

^a Ver texto. ^b (+) y (-), expresión de TCP. ^c Ver texto. N.A. No aplicable. Los valores representan el promedio de al menos tres determinaciones independientes ± la desviación estándar (D.S.).

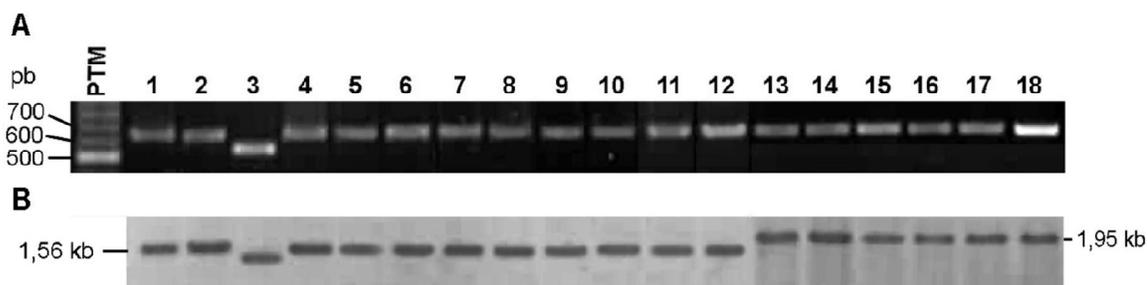


Fig. 1. Presencia del gen *tcpA* en diferentes cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*. A) Electroforesis en gel de agarosa de ADN, amplificado por PCR del gen *tcpA* de las cepas: (PTM) Patrón de tallas moleculares, (pb). 1, C6706; 2, KHT46; 3, KHT52; 4, C7258; 5, E7946; 6, N16961; 7, Lima; 8, Gamene; 9, CRC266; 10, MO45; 11, SG25-1; 12, MDO12C; 13, 1395, 14, CA401; 15, O395; 16, CA385; 17, NIH35A3; 18, 569B. B) *Southern blotting*. Se utilizó como sonda un fragmento de ADN que comprende el gen *tcpA*. Las muestras correspondieron al mismo orden mostrado en A). KHT52 (3) muestra una banda de alrededor de 100 pb menor, debido a una delección en el gen *tcpA*, revelada por ambas técnicas, PCR y *Southern Blotting*.

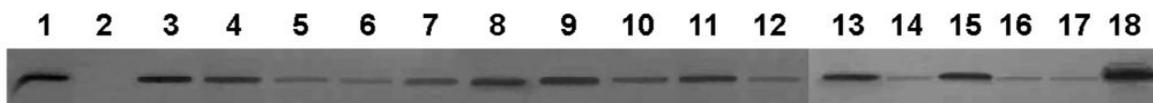


Fig. 2. Expresión de *IcpA* en cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*, revelado por Western blotting. Se aplicó un extracto de células completas de las cepas: 1) C6706; 2) KHT52; 3) KHT46; 4) C7258; 5) E7946; 6) N16961; 7) Lima; 8) Gamene; 9) CRC266; 10) MO45; 11) SG25-1; 12) MDO12C; 13) 1395, 14) CA401; 15) O395; 16) CA385; 17) NIH35A3 y 18) 569B. La cepa KHT52, portadora de una delección en el gen *tcpA*, no produjo ninguna señal. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-TcpA 10E10E1.

ción el anticuerpo anti-TcpA 10E10E1.⁹ Todas las cepas toxigénicas salvajes evaluadas expresaron TCP, aunque a concentraciones variables (Fig. 2).

Dentro del grupo de cepas del biotipo Clásico, CA385 y CA401 mostraron una autoaglutinación extrema (98,3 % para la primera y 11,0 % para la segunda) y ambas expresaron TCP a niveles similares (Fig. 2), a pesar de la gran diferencia en la autoaglutinación observada bajo las mismas condiciones de cultivo (Tabla 1). La cepa 569B presentó una baja autoaglutinación y sin embargo, fue la que expresó TcpA en mayor cantidad entre las cepas Clásicas (Fig. 2). En las cepas del biotipo El Tor se observó una autoaglutinación entre 14 y 34 %, valores comparativamente bajos con respecto a CA385 (98,3 %) y no se observó correlación entre este fenotipo y los niveles de expresión de TcpA (Tabla 1, Fig. 2). En este biotipo, se incluyeron las cepas isogénicas KHT46 y KHT52¹⁰ y su cepa de origen C6706. KHT46 porta una delección en el gen de la pilina principal de la fimbria hemaglutinina sensible a manosa (MSHA), en tanto que KHT52 porta una delección en el gen *tcpA*. Aunque C6707 y KHT46 expresan normalmente TCP y KHT52 no produce esta fimbria, las tres cepas mostraron una autoaglutinación similar (19, 20 y 20 %, respectivamente; Tabla 1). En las cepas pertenecientes al serogrupo O139 la autoaglutinación osciló entre 22 y 40 % y solamente la cepa SG25-1 la mostró relativamente elevada (79 %). Sin embargo, en estas cepas tampoco se observó una asociación directa entre autoaglutinación y expresión de *tcpA* (Tabla 1, Fig 2).

En las cepas Clásicas, la susceptibilidad a una variante El Tor del fago CTXφ marcada con un gen de resistencia a la kanamicina (CTX-knφ) fue evaluada mediante la aparición de transductantes resistentes a kanamicina en unidades formadoras de colonias (UFC Kn^R) sobre medio LB sólido + kanamicina (50 µg/mL), luego de la infección de $\approx 10^8$ células, con una suspensión de $\approx 2 \cdot 10^6$ partículas virales de CTX-knφ transductantes/mL.¹¹ El límite de detección del ensayo fue de 50 UFC Kn^R/mL. El resto de las cepas (El Tor y O139) fue excluido de este análisis, por ser inmunes a la infección con CTXφ El Tor.¹² A diferencia de la autoaglutinación, se observó una asociación directa entre la susceptibilidad al fago y la expresión de TcpA (Tabla 1, Fig 2). La susceptibilidad al fago CTX-knφ fue máxima en la cepa 569B ($1,5 \cdot 10^6$, Tabla 1) e igualmente mostró una mayor expresión de TcpA (Fig. 2). Es notable que en las cepas CA385 y CA401 la susceptibilidad al fago resultara menor que el límite de detección del ensayo de infección (50 UFC/mL), siendo la expresión de TcpA baja en ambas cepas (Tabla 1, Fig. 2).

Los resultados anteriores difieren de los obtenidos por Kirn *et al.*,⁴ puesto que no se observó una asociación entre la expresión de TCP y el fenotipo de autoaglutinación en las diferentes cepas epidémicas de los serogrupos

O1 y O139. De hecho, aunque todas las cepas tipo salvaje estudiadas presentaron el gen *tcpA* y expresaron la proteína correspondiente TcpA, la autoaglutinación fue pobre en la mayoría de ellas. Por otra parte, en las cepas del biotipo Clásico tampoco se observó una asociación directa entre la expresión de TCP y la autoaglutinación. Esta solo fue evidente a simple vista en la cepa CA385, que sin embargo, expresó pobremente TcpA y fue resistente a la infección con el fago CTX-knφ, lo que sugiere una asociación directa entre expresión de TCP y susceptibilidad a CTX-knφ. Si la gran autoaglutinación mostrada por la cepa CA385 estuviera relacionada con una elevada expresión de TCP, entonces debía esperarse una susceptibilidad a CTX-knφ también elevada. Por otro lado, en la cepa 569B se observó lo inverso, esta mostró una baja autoaglutinación y sin embargo, fue la más susceptible al fago CTX-knφ y la que expresó TcpA en mayor cantidad (Tabla 1).

Por tanto, la conclusión fundamental de este trabajo es que no existe una asociación evidente entre la expresión de la fimbria TCP y el fenotipo de autoaglutinación, como afirman los autores Kirn *et al.*⁴ Las conclusiones a que arribaron estos autores se derivan de un análisis mutacional a partir de una sola cepa de origen. En este estudio, las cepas utilizadas fueron cepas patogénicas de origen diverso, por lo que los resultados son más generalizables. Si TCP estuviera realmente involucrado directamente en el fenómeno de la autoaglutinación, estos resultados sugieren que esta función de la fimbria debe estar enmascarada (inhibida) por otros factores presentes en las cepas que no autoaglutinaron, o potenciado por factores adicionales en el caso de las cepas que manifestaron este fenotipo.

Por otra parte, pudieran existir otras aglutininas involucradas en el fenómeno,¹³ como en el caso de la cepa CA385, donde el fenotipo de autoaglutinación se manifiesta aun en condiciones no idóneas de expresión de TCP. Los resultados del presente trabajo indican que es necesario continuar el estudio del papel de TCP en el fenómeno de la autoaglutinación y la colonización intestinal por *V.cholerae*, así como su interrelación con otros factores que pudieran estar involucrados en estas funciones. Para dilucidar el papel de la fimbria TCP en la autoaglutinación sería interesante investigar en el futuro el comportamiento de mutantes *tcpA*-negativos en las cepas que muestran mayor autoaglutinación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faruque S.M., Albert M.J. and Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **62**, 1301-1314, 1998.
2. Kaper J.B., Morris J.G. Jr. and Levine M.M. Cholera. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**, 48-86, 1995.
3. Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910-1914, 1996.

4. Kirn T.J., Lafferty M.J., Sandoe C.M. and Taylor R.K. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, **35**, 896-910, 2000.
5. Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B. and Mekalanos J.J. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **84**, 2833-2837, 1987.
6. Rhine J.A. and Taylor R.K. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, **13**, 1013-1020, 1994.
7. Chiang S.L., Taylor R.K., Koomey M. and Mekalanos J.J. Single amino acid substitutions in the N-terminus of *Vibrio cholerae* TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance. **Mol. Microbiol.**, **17**, 1133-1142, 1995.
8. Iwanaga M. and Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. **J. Clin. Microbiol.**, **22**, 405-408, 1985.
9. Falero G., Rodriguez B.L., Rodriguez I., Campos J., Ledon T., Valle E. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to E1 Tor toxin co-regulated pilus of *Vibrio cholerae*. **Hybrid. Hybridomics.**, **22**, 315-320, 2003.
10. Thelin K.H. and Taylor R.K. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. **Infect. Immun.**, **64**, 2853-2856, 1996.
11. Campos J., Martinez E., Marrero K., Silva Y., Rodriguez B.L., Suzarte E. *et al.* Novel type of specialized transduction for CTX or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ ϕ in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **185**, 7231-7240, 2003.
12. Kimsey H.H. and Waldor M.K. CTX ϕ immunity: application in the development of cholera vaccines. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **95**, 7035-7039, 1998.
13. Kirn T.Y. and Taylor R.K. TcpF is a soluble colonization factor and protective antigen secreted by El Tor and Classical O1 and O139 *Vibrio cholerae* serogroups. **Infect. Immun.**, **73**, 4461-4470, 2005.